

**Prüfung eines Phosphonsäureesterpräparates
(S. 1752 Bayer) auf seine Wirksamkeit
gegenüber Trichinellen bei der experimentell
infizierten Maus**

Wolfgang Meilinger

1964

Aus dem Institut für Zoonosenforschung
der Johann Wolfgang GOETHE-Universität
zu Frankfurt/Main
Direktor: Professor Dr.G.SCHOOP

Prüfung eines Phosphonsäureesterpräparates (S 1752 Bayer)
auf seine Wirksamkeit gegenüber Trichinellen
bei der experimentell infizierten Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe - Universität zu Frankfurt

Eingereicht von
Wolfgang Meilinger
aus Fulda
Frankfurt 1964



Dekan Prof. Dr. H. F r i c k
Referent : Prof. Dr. G. Schoop
Korreferent : Priv.Doiz.Dr.G. May

Tag der mündlichen Prüfung : 17.Dezember 1964

- Inhaltsverzeichnis -

I. Einleitung

II. Literatur

1. Besprechung der Literatur zur Trichinose

- a) Geschichte der Biologie
- b) Klinisches Bild
- c) Nachweis der Trichineninvasion
- d) Verbreitung
- e) Prophylaxe
- f) Therapie

2. Phosphorsäureester

- a) Struktur
- b) Nervenleitung
- c) Biochem. Angriffspunkt

III. Eigene Versuche

1. Material und Technik

2. Verträglichkeitsversuche

3. Hauptversuche

- a) Behandlungsbeginn am 1., 3., 5., 7., 9. Tag p.i.
- b) Behandlungsbeginn am 11., 13., 15., 17., 19. Tag p.i.
- c) Behandlungsbeginn am 21., 23., 25., 27., 29., 31. Tag.

IV. Besprechung der Ergebnisse

V. Zusammenfassung

VI. Literaturangaben

Einleitung

Seit S C H O O P und L A M I N A mit dem Phosphonsäureester "Neguvon" eine wirksame Substanz gegen die Trichinellen gefunden hatten, kam es darauf an, die geeignete Form und Applikationsart für das Präparat zu finden.

Die Untersuchungen im Institut für Zoonosenforschung haben sich bisher im wesentlichen mit der wässrigen Lösung des "Neguvon" befaßt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mir die Aufgabe gestellt, das Phosphonsäureester-Präparat "S 1752" (Bayer) auf seine Wirksamkeit gegen Trichinellen zu untersuchen. Dabei sollten alle Stadien des Parasitenbefalls, also das geschlechtliche Stadium im Darm, die Blutpassage und die Gewebswanderung der Larven, sowie die eingekapselten Trichinen im invasionsbereiten Zustand berücksichtigt werden.

Nach den Aufzeichnungen von Herodot und Plutarch war im alten Ägypten der Genuß von Schweinefleisch untersagt, weil dieses Fleisch eine "Verseuchung der Kräfte" verursache. Einige Autoren vermuten, daß Moses von Krankheiten, die nach dem Genuß von Schweinefleisch auftraten und sich in Schmerzen, Muskelschwäche und Bewegungsbehinderung äußerten, Kenntnis hatte, als er den Israeliten befahl, Schweinefleisch zu meiden. Danach verlor sich jede Spur über das Wissen von einem Krankheitserreger in Schweinefleisch.

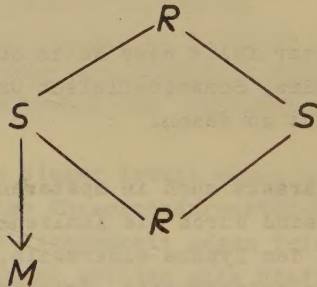
Jahrhunderte später fällt eine Notiz auf. Hier gebot Papst Zacharias, Schweinefleisch und Speck nicht anders als gekocht zu essen.

Sicher hat der Parasit auch in späteren Zeiten Opfer gefordert, doch sind durch die Ähnlichkeit der Symptomatologie mit dem Typhus einerseits, und rheumatischen Zuständen andererseits, Trichinoseerkrankungen wahrscheinlich nicht erkannt worden.

Im Jahre 1835 wurde der Rundwurm von dem damaligen Studenten PAGET in Cambridge entdeckt. Der Zoologe OWEN machte fast zur selben Zeit die gleiche Beobachtung. Er veröffentlichte den Befund und nannte den Parasiten wegen der aufgerollten Form Trichinella spiralis.

1846 fand LEIDY Trichinenkapseln im Schweinefleisch. Beim Tod eines Mädchens erkannte ZENKER die Pathogenität der Trichine für den Menschen. Später konnte LEUCKART den Kreislauf dieses Parasiten darstellen. Seiner Meinung nach machte das Tier einen Wirtswechsel von der Ratte zum Schwein durch und ging von da gelegentlich auf den Menschen über.

Dieser zuerst erkannte und zu der damaligen Zeit vielleicht bedeutungsvollste Kreislauf des Parasiten vom Schwein über die Ratte zum Schwein wurde in Deutschland durch die Trichinenschau aufgehoben.



Für die Ratte besteht kaum noch die Möglichkeit, sich zu infizieren, weil alle trichinösen Schweine unschädlich beseitigt werden. Da jedoch durch die Fleischbeschau (1878 in Preußen, 1937 in ganz Deutschland) die Trichinose nicht vollends zum Erliegen kam, wurde nach anderen Überträgern gesucht.

Nach den Untersuchungen von SCHOOP und SCHADE im Jahre 1939 stellen Rotfüchse und Dachse das Haupttrichinenreservoir dar. Diese Ergebnisse wurden erst kürzlich von SCHOOP und LAMINA durch eine neue Unter-

suchungsreihe an mehreren hundert Füchsen als noch zutreffend gefunden. Nach einem Erlaß sind zwar Fuchskerne unschädlich zu beseitigen, doch erscheint es fraglich, ob immer nach dieser Weise verfahren wird. Seit diesen Untersuchungen sind auch Füchse und Dachse sowie andere fleischfressende Tiere der Trichinenschau zu unterziehen, falls sie der menschlichen Ernährung dienen sollen. Geflügel stellt keine Infektionsquelle für den Menschen dar, da Vögel nicht zu den biologischen Wirten gehören.

Biologie

Trichinella spiralis gehört zur Familie der Trichinelloideae, innerhalb des Stammes der Nematoden. Die Trichinen sind vivipar und getrenntgeschlechtlich. Die Männchen sind 1,4 - 2,2 mm lange und 30 - 40 breite Rundwürmer. Die Weibchen werden 3 - 4 mm lang, sind aber nur 40 - 60 breit. Der Wurm verjüngt sich zum Vorderende hin. Die Haut ist chitinos, farblos, elastisch und an der Körperoberfläche leicht geringelt. Der Ösophagus ist ein sehr langes, cuticuläres Rohr, das, abgesehen von einem muskulösen Vorderteil, auf der Dorsalseite mit großen Zellen belegt ist. Diese haben wahrscheinlich die Funktion von Verdauungsdrüsen. Der birnförmige Magen geht in den Mitteldarm und muskulösen Enddarm über. Der After liegt endständig. Die männlichen Geschlechtsorgane münden in der vorstülpbaren Kloake, die auf beiden Seiten Saugnäpfe hat, die zum Festhalten dienen. Der weibliche Geschlechtsapparat ist nur einfach ausgebildet. Von dem Eierstock in der hinteren Körperhälfte führt ein Eileiter zum Genitalporus in der vorderen Körperhälfte. Hier treten auch die Jungtrichinen aus.

Gelangt mit der Nahrung trichinöses Fleisch in den Magen, werden sofort die Trichinenkapseln vom Magensaft angegriffen. Auch stark verkalkte Kapseln werden schon bei niedriger HCL Konzentration angedaut. Innerhalb von 8 - 10 Stunden nach der Infektion dringen die Trichinen in das stratum proprium der Dünndarmschleimhaut. Mit Unterstützung von Enzymen vermögen sie das Epithel zu durchbohren. Bei der Einwanderung können sie erhebliche Zerstörungen an den

Darmzotten anrichten. Geschlechtsreif sind die Darmtrichinen nach etwa zwei Tagen. Die Begattung erfolgt innerhalb des Darmlumens während des Aufenthaltes in der Zottenschleimhaut. Die Weibchen bringen im Darm ihre Jungen zur Welt. Diese Jungtrichinen gelangen mit dem Lymphstrom passiv durch den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf. Nach einer gewissen Zeit verlassen sie das Blutgefäßsystem und siedeln sich in der quergestreiften Muskulatur an. Die meisten Jungtrichinen findet man zwischen dem 10. und 20. Tag im Blutstrom. Nach dem 24. Tag sind sie nicht mehr im Blut nachweisbar. Die Verteilung innerhalb der Körpermuskulatur ist unterschiedlich. Am stärksten besiedelt sind sauerstoffreiche Muskelpartien, wie Zwerchfell-, Kau-, Zwischenrippen-, Augen- und Kehlkopfmuskulatur. Der Herzmuskel bleibt frei von Trichinen. Vom 6. Tag nach der Geburt an wandern die Trichinellenlarven aktiv in die quergestreifte Muskulatur ein. Sie dringen in die Primitivbündel und verursachen eine Degeneration der kontraktiven Substanz; die Querstreifung verschwindet. Nach zwei Tagen ist die junge Muskeltrichine von basophilkörnigen Zerfallprodukten der Muskelfaser umgeben. Vom Perimyrium aus scheidet sich als Reaktion des Wirtes ein hyalines Häutchen ab, das die Larvenkapsel bildet. Nach 5 - 6 Wochen ist die Kapselbildung abgeschlossen und die Trichine liegt aufgerollt in ihr. Die Jungtrichine verharrt in diesem Stadium, bis sie in einen neuen Wirt gelangt. Beim Schwein ist sie bis zu 11, beim Menschen bis zu 30 Jahre noch invasionsfähig. An den Kapselpolen setzt häufig über kurz oder lang eine Fettablagerung ein. Frühestens nach 5 Monaten beginnt die Kapsel zu verkalken, die Verkalkung ist jedoch nicht zwangsläufig.

Trichinose

Die Empfänglichkeit der verschiedenen Wirtsorganismen für eine Trichineninfektion ist sehr unterschiedlich. Die Mehrzahl der Tiere reagiert nicht, selbst bei Infektion mit einer großen Anzahl von Trichinen. Der Mensch ist einer der empfindlichsten Wirte. Abhängig ist das Krankheitsbild der Trichinose in seiner Schwere und Dauer von der Stärke des Parasitenbefalls. Von symptomlosen und unterschwelligem Verlaufsformen gibt es alle Übergänge bis zu den allerschwersten Krankheitszuständen mit tödlichem Ausgang.

Bei stärkeren Infektionen treten in den ersten Tagen nach dem Fleischgenuß leichte Prodromalsymptome auf mit Leibschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und uncharakteristischen Durchfällen, die ausnahmsweise auch blutigen Charakter annehmen und mit mäßigem Fieber einhergehen können. Die Muskelinvasion vom 7. Tag an äußert sich klinisch in immer stärker werdenden Muskelschmerzen. Vom 11. Tage der Infektion an setzt das zweite Stadium der Erkrankung mit starkem Krankheitsgefühl, Kopfschmerz, Schüttelfrost und Fieber ein. Es treten charakteristische urticarielle Erscheinungen auf mit Schwellung des Gesichts, des Skrotums und der Extremitäten. Besonders typisch sind die rezidivierenden Lidödeme. Bei erhaltenem Bewußtsein besteht oft Apathie und auffallende Schlaflosigkeit. Infolge der starken Muskelschmerzen liegen die Kranken mit starrem Blick, amimisch, mit halbgebeugten Extremitäten, völlig regungslos im Bett, ängstlich bemüht, jede Bewegung zu vermeiden. An den Augen tre-

ten subkonjunktivale Blutungen auf. SEMPLE, DAVIES, KERSHAW und HILL fanden 1953 bei einem Trichinose - ausbruch in Liverpool, der 82 Personen umfaßte, die Symptome wie folgt verteilt :

Lidödeme	100 %	Schlaflosigkeit	56 %
Gesichtsödem	74 %	Obstipation	35 %
Muskelschmerz	94 %	Nackensteifigkeit	32 %
Kopfschmerz	88 %	Lethargie	32 %
Lichtscheu	66 %	Gleichgewichts- störung	28 %

Die Temperatur verläuft in den ersten Tagen als Continua zwischen 39 - 41° C. Die Pulsfrequenz ist erniedrigt. Das Blutbild weist eine mäßige Leucocytose mit relativer Lymphopenie und einer oft extrem hohen Eosinophilie von 40 - 60 % auf, die meist in der 3. - 5. Krankheitswoche ihren Höhepunkt erreicht und sich noch lange Zeit bis in die Rekonvaleszenz verfolgen läßt. Die BSG ist nur mäßig beschleunigt. Der Blutzucker liegt meist unter der Norm. Die Hypoglykämie tritt langsam ein, dauert sehr lange an, sinkt jedoch nicht unter 60-70 mg %. Bei schweren Erkrankungen kommen Kreislaufstörungen hinzu: Myokarditis, Blutdrucksenkung, Neigung zu Blutungen sowie zu Thrombosen und Embolien. Bei schweren Infektionen werden Meningismus, Bewußtseinstörungen und Delirien beobachtet. Neurologisch findet sich manchmal gesteigerte, aber oft auch stark herabgesetzte Reflexauslösbarkeit.

Die bei der Trichinose wirksamen Stoffe sind verschiedener Herkunft. Es handelt sich einmal um die Einwirkung proteolytischer Fermente des Wurms, zum anderen um giftige muskuläre Stoffwechselprodukte des Patienten. Der Gesamtstickstoff und der Glykogengehalt im

Muskel sind herabgesetzt, der Ammoniak-Milchsäure- und Wassergehalt erhöht. Außerdem enthält die Muskulatur den Purinbasen nahestehende Gifte. FLURY konnte durch Injektionen von Extrakten aus dem trichinösen Muskel klinische Symptome einer Trichinose erzeugen.

Nachweis der Trichineninvasion

Wenn es auch häufig gelingt, an Hand der beschriebenen klinischen Symptome eine Trichinose zu diagnostizieren, wird man doch versuchen, durch einen Nachweis des Parasiten die Diagnose zu erhärten. In den USA, wo etwa^{je} der 6. Amerikaner von Trichinen befallen ist, geht nur ein Bruchteil der Erkrankungen mit faßbaren klinischen Symptomen einher.

In der Humanmedizin bedient man sich verschiedener Methoden zum Nachweis der Trichinen. Man kann einmal versuchen, die Trichinellen durch Muskelbiopsie zu erfassen, doch ist die Wahrscheinlichkeit eines positiven Befundes erst im Spätstadium der Erkrankung möglich. Das Auftreten von Antikörpern im Serum machen immunbiologische Reaktionen für die Diagnostik verwertbar. Gebräuchlich von den serologischen Untersuchungsmethoden sind

1. Die Intracutanreaktion.

Nach einer intracutanen Injektion von Trichinellen-Antigen in bestimmter Verdünnung kommt es innerhalb von 10 Minuten an der Injektionsstelle zu einer Hautrötung, Schwellung und nachfolgender Ausbildung einer weißlichen Quaddel.

2. Die Komplementbindungsreaktion.

Sie kann ab dem 3. Tag, meist nach dem 20. Tag, positiv werden.

3. Die Präcipitationsreaktion.

Diese Nachweisreaktion ist in der 5. Woche nach der Infektion positiv und bleibt es 1 - 9 Jahre lang.

Die Intracutanprobe ist wohl am einfachsten auszuführen und liefert die schnellsten Resultate. Es hat sich

jedoch gezeigt, daß sie keinesfalls spezifisch für eine Trichinelleninvasion ist, sondern bei fast allen Nematodeninvasionen positiv werden kann. Die Komplementbindungs- und Präzipitationsreaktion liefern eine größere Sicherheit, nachdem es gelungen ist, ein reines Trichinellenantigen herzustellen (GAASE).

Verbreitung der Trichinose

Bei einer Betrachtung der Statistiken über die Verbreitung der Trichinose in der Welt (PIEKARSKI, 1954) ist ersichtlich, daß sich die Trichinose vorwiegend über Amerika, Europa, die Arktis und Kleinasien erstreckt. In Ländern mit einer gesetzlichen Fleischbeschau sind die Trichinoseerkrankungen erheblich zurückgegangen.

Aus der Zeit zwischen den beiden Weltkriegen sind in Deutschland 4 größere Epidemien bekannt:

1922	in Erlangen	100	Personen
1924	in Weingarten	150	Personen
1926	in Vogtland	100	Personen
1930	in Stuttgart	88	Personen

Nach dem Kriege wurden Epidemien bekannt aus Hammelburg, bei der 36 Personen erkrankten (LENTZE, 1949), und aus Meschede 436 Fälle (PETRASCH und GAASE, 1952).

Abgesehen von den einzelnen Gruppenerkrankungen in den letzten Jahren sowie einer jüngsten Epidemie in Ostdeutschland (Frühjahr 1962), die noch nicht bestätigt und ausgewertet ist, spielt die Trichinose dank der Erweiterung der gesetzlichen Fleischbeschau in Deutschland keine wesentliche Rolle mehr. Nach den Untersuchungen an 300 menschlichen Leichen kam SCHOOP nach mathematisch-statistischen Berechnungen zu dem Ergebnis, daß mindestens 98,4 % der deutschen Bevölkerung als trichinenfrei anzusehen ist.

Die USA stehen an der Spitze der trichinenverseuchten Länder. An 12 000 Leichen durchgeführte Untersuchungen

ergaben, daß jeder 6. Amerikaner mit Trichinen infiziert ist (25 Millionen der Bevölkerung). Jedoch erkrankt nur ein kleiner Teil der befallenen Personen mit klinischen Symptomen. Offiziell werden 300 Trichinosefälle jährlich angegeben. Von Kennern der Materie wird die Zahl für wesentlich zu gering erachtet. *)

Trotz der starken Trichinenverseuchung haben sich die Behörden der U S A noch nicht zur obligatorischen Trichinenschau entschließen können; sie suchen nach anderen Wegen zur Bekämpfung der Trichinose.

*) Mündl. Diskussionsbemerkung von HERMANN anläßlich eines Vortrages bei der Frankfurter Medizinischen Gesellschaft.

Prophylaxe

Die Hauptanstrengungen bei der Bekämpfung der Trichinose konzentrierten sich seither auf prophylaktische Maßnahmen, da eine medikamentöse Behandlung bisher erfolglos geblieben ist. Durch Ausschaltung der Infektionsquelle konnte man dieser Seuche am wirksamsten begegnen.

Durch die Einführung der gesetzlichen Fleischbeschau, einschließlich der Trichinenschau, ist die Trichinose in Deutschland erheblich zurückgegangen. Dieses Gesetz besteht in Preußen seit fast 100 Jahren. Schon zwischen den Jahren 1862 und 1870 forderten VIRCHOW, unterstützt von LEUCKART, KÜCHENMEISTER u.a. eine einheitliche Trichinen-Gesetzgebung. Diese wurde dann 1877 für Preußen obligatorisch. Erst nach und nach schlossen sich die übrigen Länder diesem Gesetz an. Bei der Neufassung des Fleischbeschaugesetzes im Jahre 1940 wurde die Trichinenschau, ursprünglich nur für Schweinefleisch vorgeschrieben, auf alle fleischfressenden Tiere ausgedehnt, sofern sie für den menschlichen Genuß bestimmt sind.

Zur Untersuchung bedient man sich des Kompressionsverfahrens. Das Kompressorium besteht aus zwei soliden Glasplatten mit einer Felderung. 14 haferkorngroße Stückchen werden aus den Zwerchfellpfeilern herausgeschnitten, auf die 28 Felder des Kompressoriums verteilt und zerquetscht. Diese Felder werden bei 60-80 facher Vergrößerung unter dem Mikroskop nach Trichinen durchsucht. In Schlachthöfen wird neuerdings vielfach ein Projektionsbild des Präparates durchgesehen. Auf eine Million geschlachteter Schweine kommt zur Zeit etwa ein trichinöses Tier in Westdeutschland.

Auf der Suche nach weiteren Möglichkeiten einer geeigneten Prophylaxe wurden Untersuchungen angestellt, die Trichinellen durch große Hitzeeinwirkung und starke Kältegrade invasionsunfähig zu machen. Die praktische Verwertung ist insofern schwierig, als es einer langen Kälte bzw. Hitzeeinwirkung bedarf, um auch im Inneren des Fleischstückes erforderliche Temperaturen zur Abtötung des Parasiten zu erzielen. 20 Stunden lang muß eine Temperatur von -30°C auf ein 20 cm dickes Fleischstück einwirken, während Kochtemperaturen 2,5 Stunden benötigen, Trichinen im Inneren eines 10 cm dicken Fleischstückes abzutöten. Von großer praktischer Bedeutung schienen Bemühungen amerikanischer Forscher zu sein, durch Einwirkung von Röntgen und Gammastrahlen die encystierten Trichinellen abzutöten oder zu schädigen. Sämtliches auf Trichinen verdächtige Fleisch sollte einer Bestrahlung ausgesetzt werden. Für die Abtötung der Parasiten werden jedoch so hohe Strahlendosen benötigt, daß eine praktische Verwertung nicht in Frage kommt.

Die Prophylaxe ist durch die gesetzliche Verankerung der obligatorischen Trichinenschau im Fleischbeschau-gesetz zu einem Teil der öffentlichen Lebensmittel-hygiene geworden. Einige Länder sind dem deutschen Beispiel gefolgt, andere überlassen den Schutz vor dem Parasiten dem Konsumenten von Schweinefleisch selbst. Zwischen den beiden Extremen liegen viele Übergänge. So lassen zum Beispiel einige Staaten an großen Schlachthöfen Trichinenschau ausüben.

Therapie

Lange schon versuchte man, die Trichinose mit Medikamenten zu bekämpfen, doch kam man hier noch zu keinem befriedigendem Ergebnis. Die angeblich wirksamen Präparate entsprachen nicht den Anforderungen. Im enteritischen Stadium, noch bevor sich die Trichinellen in die Darmwand einbohren, sollen Laxantien wie Glycerin, Calomel und Bittersalze die Darmtrichinen abtreiben. Die gegen die Muskeltrichinen versuchten Mittel sind alle ohne trichinozide Wirkung geblieben. Der komplexen Antimon-III-Verbindung Fuadin wurde eine parasitizide Eigenschaft zugeschrieben, doch lassen sich weder Darm- noch Muskeltrichinen durch dieses Medikament therapeutisch beeinflussen. Allein Hetrazan (1-Diäthyl-carbamyl-4-methylpiperazin) hat bei Versuchen an Ratten und Mäusen eine geringe Wirkung auf Darmtrichinen erkennen lassen.

S C H O O P und L A M I N A führten mit dem Phosphorsäureester "Neguvon" (Bayer) ein neues, systemisch wirkendes Präparat zur Behandlung der Trichinose ein. Der Begriff der systemischen Wirksamkeit stammt aus der Pflanzenparasitologie. Er besagt, daß der Parasit nicht selbst durch das Mittel getroffen sein muß, sondern daß der betreffende Wirt über sein Kreislaufsystem das wirksame Präparat an den Parasiten heranträgt.

Das Präparat wurde aus einer Gruppe von Pflanzenschutzmitteln entwickelt. Es ist ein weißes, schwach riechendes, in Wasser gut lösliches, kristallines Pulver.

ROBBINS, HOPKINS und EDDY klärten an mit radioaktivem Phosphor markierten "Neguvon" den Stoffwechsel des Präparates. Zur höchsten Konzentration kommt es nach 3 Stunden, die Ausscheidungsspitze ist schon nach 5 1/2 Stunden erreicht. Der Hauptanteil von "Neguvon" wird mit dem Harn ausgeschieden. Genauso schnell wie das Blut mit "Neguvon" angereichert wird, setzen bei Überdosierungen auch die Vergiftungserscheinungen ein.

Bei Versuchen, die am hiesigen Institut mit experimentell infizierten Mäusen durchgeführt wurden, konnten "Darmtrichinen" in 100 % abgetötet werden, die Vernichtungsquote bei "Wandertrichinen" lag um 70 %. Unter Schutz des Antidotgemisches PAM (Bayer) und Atropin war es möglich, die normalerweise für das Versuchstier tödliche Dosis erheblich zu überschreiten. Mit dieser Maximaldosis gelang es dann auch, den größten Teil der eingekapselten Trichinenlarven zu beseitigen. Die noch überlebenden Muskeltrichinellen betrugen nach einer langfristigen Behandlung 1,7 % gegenüber den Kontrollen.

In weiteren Versuchen mit experimentell infizierten Mäusen wurde der Phosphonsäureester "Asuntol" (Bayer) auf seine parasitiziden Eigenschaften untersucht. Das Präparat lag für die interne Applikation in zwei Formen vor: als gelblich klare, schwach visköse Flüssigkeit und als hellbraunes Pulver in feinsten Verteilung. Der Asuntol-Wirkstoff ist in organischen Lösungsmitteln löslich, in Wasser nahezu unlöslich. Auf Grund der Schwerlöslichkeit und der daraus resultierenden ungleichmäßigen Verteilung von Asuntol in Lösungen, war die Innehaltung eines genauen Dosierungsschemas nicht möglich.

Bei der Behandlung der Trichinose im enteritischen Stadium mit Asuntol-Formulierung betrug der Therapieerfolg 100 %. Die gleichen Ergebnisse wurden bei dem Behandlungsversuch mit Asuntol-Pulver erzielt, doch lag hier die Mortalität wesentlich höher. Bei der Bekämpfung der encystierten Parasitenlarven erwies sich die Asuntol-Formulierung unter Prämedikation von Atropin und PAM am wirksamsten. Hier gelang teilweise eine 75 %ige Abtötung der Trichinen. Eine antiparasitäre Behandlung der Trichinose hat es also ca. ein Jahrhundert nach Entdeckung der Krankheit nicht gegeben. Erst mit dem Piperazinderivat Hetrazan fand sich ein eventuell auf das Darmstadium verwendbares Präparat. "Wanderlarven" und abgekapselte Trichinellenlarven werden von Piperazin kaum beeinflusst. Erst die Einführung von Mitteln mit systemischer Wirkung konnte hier einen Wandel schaffen. Immer noch bleiben aber die "Darmtrichinen" diejenigen Stadien der Parasiten, die der chemotherapeutischen Einwirkung am zugänglichsten sind. Der Schritt vorwärts liegt nun darin, daß auch die Larvenstadien außerhalb des Darmes, sowohl während der Blutpassage als auch während der Einwanderung in die Muskulatur und selbst in der Kapsel größtenteils, vernichtet werden.

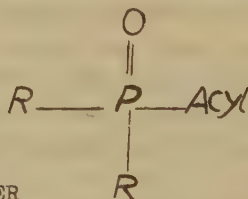
Das Prinzip der Chemotherapie der Trichinose liegt also fest. Da jedoch die Phosphonsäureester eine relativ starke Toxizität besitzen, ist die Frage der Form, in welcher das Präparat verabreicht wird, sowie der Weg seiner Applikation von besonderer Wichtigkeit. Die Prüfung der übergebenen Formulierung sollte in dem Sinne vorgenommen werden, ob sich das Präparat in dieser Form zur Behandlung der experimentellen Trichinose eigne und welcher Weg dafür in Frage komme.

2. Phosphorsäureester

a) Struktur

Alle biologisch wirksamen organischen Phosphorsäureester (Alkylphosphate) entsprechen einem ganz bestimmten Aufbau-Schema. Sie erfüllen nach SCHRADER (1957) folgende Voraussetzungen :

1. 1-5wertiger Phosphor als Zentralatom,
2. am Zentralatom doppelt gebundener Sauerstoff oder Schwefel,
3. zwei Alkyl oder Alkoxy-Reste oder auch zwei basische Reste, wie z.B. die Reste von sekundären Basen können an Phosphor gebunden sein,
4. für die fünfte Valenz des Phosphors muß ein acider Rest übrigbleiben. Es ergibt sich so - mit folgendes allgemeine Formelbild eines aktiven Phosphorsäureesters :



SCHRADER
(1957)

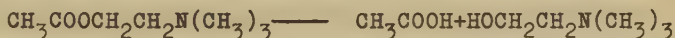
Im allgemeinen handelt es sich um mehr oder weniger flüchtige Verbindungen, die sich im Wasser kaum, wohl aber in organischen Lösungsmitteln lösen, und die im alkalischen Milieu (pH oberhalb 8) meist schnell hydrolysieren und damit ihre Wirksamkeit verlieren.

b) Nervenleitung

Die Übertragung der nervösen Impulse von der auf das

Erfolgsorgan, geschieht bekanntlich auf chemischem Weg. An den Nervenendigungen werden bestimmte Überträgerstoffe freigesetzt, die die Reaktion des Erfolgsorgans bedingen. Der Wirkstoff der sympathischen Nerven, das Noradrenalin, wird an den Endplatten der postganglionären sympathischen Fasern, das Acetylcholin an den Endplatten der parasympathischen, den präganglionären sympathischen und motorischen Nervenfasern frei. Durch das Ferment Acetylcholinesterase wird das Acetylcholin fast augenblicklich nach der Freisetzung hydrolysiert (Größenordnung des Zeitintervalls 1 Millisekunde).

Die Acetylcholinesterase spaltet Acetylcholin in Essigsäure und Cholin.



Sie kommt in Gehirn und Nerven und neben anderen Esterasen auch in den Erythrocyten vor. Dieses Ferment ist an der Oberfläche des Axons, an den Synapsen und motorischen Endplatten in sehr hoher Konzentration vorhanden.

c) Biochemischer Angriffspunkt

Indem die organischen Phosphorsäureester die Esterase phosphorylieren, bewirken sie die Fermentblockade. Sie gehen eine chemische Verbindung mit dem Ferment ein. Die Bindung der Phosphorylgruppe an die Esterase ist schlecht reversibel im Gegensatz zu den nicht phosphorhaltigen Esteraseblockern Eserin und Prostigmin. Eine spontane Reaktivierung des blockierten Ferments erfolgt bei den meisten Alkylphosphaten so langsam, daß eine Restitution aktiver Esterase vorwiegend auf

dem Wege einer Neubildung des Ferments zustande kommt. Infolgedessen muß es zu einer Anreicherung von Acetylcholin kommen.

Es treten daher vorwiegend parasymphathicomimetische Erscheinungen in allen vegetativ innervierten Organen auf. Neben den spezifischen Vergiftungserscheinungen kommt es auch am Beginn der Vergiftungen zu einer Reihe weniger spezifischer Allgemeinstörungen, die eine frühzeitige Beteiligung des Zentralnervensystems erkennen lassen, wie Ataxie, Schwindel, Vertikalnystagmus, Tremor, Schläffigkeit, allgemeine Schwäche, Verwirrung und koma-töse Zustände.

Als wichtigstes diagnostisches Symptom der Vergiftung gilt die M i o s i s. Durch Spasmen des Sphinkter pupillae kommt es zu hochgradiger Pupillenverengung. Die Betroffenen klagen über heftigen Stirnschmerz und Druckgefühl im Augapfel. Parasympathisch innervierte Drüsen zeigen Sekretionssteigerungen: Reichlich dünnflüssigen Speichel, Tränenfluß, Bronchialsekretion. An der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Kanals kommt es schon im ersten Stadium der Vergiftung zu heftigen Spasmen mit Koliken und Brechdurchfällen. Das Herz wird bei schweren Vergiftungen bradycard und zeigt EKG-Veränderungen im Sinne einer Überleitungsverzögerung bis zur völligen Vorhof-Kammer-Dissoziation.

Am G e f ä ß s y s t e m ist bei Vergiftungen mit Phosphorsäureestern sowohl Blutdruckerhöhung als auch Blutdrucksenkung (nach stärkerer Dosierung) beobachtet worden. Für viele Alkylphosphate wurden bronchospastische Wirkungen beschrieben. Es kommt zur Dyspnoe. Die entscheidende Todesursache bei allen Versuchstieren ist eine zentrale Atemlähmung.

Am S k e l e t t m u s k e l kommt es schon früh -
zeitig zu heftigen fibrillären Muskelzuckungen in -
folge der Acetylcholinernerregung an der motorischen
Endplatte, denn eine Durchschneidung der motorischen
Nervenstämme beeinflußt die fasciculären Zuckungen
nicht. Durch Curarisierung lassen sie sich aufheben.
Bei höherer Dosierung der Alkylphosphate kommt es
zur Lähmung.

Postmortal wird von fast allen Autoren das Bestehen
eines Lungenödems beschrieben, das sich an der Leiche
oft schon in Form eines Schaumpilzes vor Mund und
Nase zu erkennen gibt. Eine Gefäßlähmung und Durch -
lässigkeitsteigerung der Gefäße wurde nicht nur an
der Haut (Totenflecke), sondern auch im Darmkanal und
im Gehirn beschrieben.

III. E i g e n e V e r s u c h e

1. Material und Technik

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche Albino-Mäuse benutzt. Die vier Wochen alten Tiere hatten ein Gewicht von durchschnittlich 20 g. Sie wurden jeweils in Gruppen zu 5 Tieren eingeteilt und in mit Torfeinstreu versehenen Glasbehältern gehalten. Zur Fütterung dienten Hafer, gepreßtes Fertigfutter, gelegentlich Grünfutter und Brot. Dem Trinkwasser wurden Vitamine beigemischt, und zwar die Vitamine A, E und D. Das Infektionsmaterial lieferten weiße Ratten, die Monate vorher mit je 500 Trichinen infiziert worden waren; die Trichinen waren also alle abgekapselt. Um die Fleischportionen, die verfüttert werden mußten, möglichst klein zu halten, wurde hauptsächlich Kaumuskulatur und Zwerchfellmuskulatur verwendet, da die Trichinellen in den Muskelpartien, die am besten mit Sauerstoff versorgt werden, am häufigsten anzutreffen sind. Die Muskelstückchen wurden mit der Schere zerkleinert, auf die einzelnen Felder des Kompressoriums verteilt und zu einem schmalen Film gepreßt.

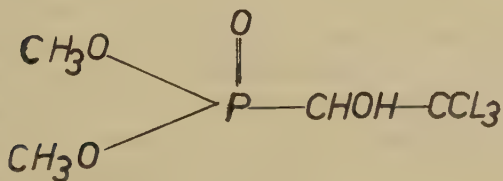
Die Größe der trichinösen Fleischstückchen wurde so gewählt, daß sie bei Lupenvergrößerung unter dem Mikroskop gut zu überblicken waren und sich bequem zu Portionen von je 100 Trichinen zusammenstellen ließen.

Spätestens 48 Stunden nach der Zusammenstellung der Portionen wurden die Mäuse mit Hilfe einer gebogenen Pinzette mit dem Trichinenmaterial gestopft, anschließend einzeln in Gläser gesetzt und beobachtet, ob sie nicht Teile des trichinösen Fleisches wieder hervor-

würkten. So wurde die Infektionsdosis von 100 Trichinen pro Versuchstier gewährleistet. Die infizierten Mäuse kamen in beschriftete Behälter, um eine Verwechslung auszuschließen.

Die behandelten Versuchstiere wurden frühestens 5 Wochen p.i. mittels eines Chloroform-Äthergemisches, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Kapselbildung der Trichinellenlarven in der Muskulatur abgeschlossen war, getötet. Zur Auswertung wurden der Hinterschenkel-Muskulatur an drei verschiedenen Stellen (Mm. quadriceps, biceps femoris und gastrocnemius) drei mal 100 mg entnommen. Der durchschnittliche Befall dieser Muskelstücke ergab, mit 10 multipliziert, die Anzahl der Trichinen pro Gramm Schenkelmuskulatur. Bei der Auszählung wurden die eindeutig geschädigten Trichinen prozentual im Verhältnis zu den Kontrollen ermittelt. Mit der Infektion einer Versuchsreihe wurde jeweils eine Gruppe von Kontrollmäusen ausgewählt, die Anzahl der Kontrollmäuse mußte wenigstens so groß sein, wie die einer Versuchsgruppe.

Das zu prüfende Medikament war ein Phosphonsäureester in Form von "Neguvon" (Bayer). In der Literatur ist das Präparat unter der Bezeichnung L/13/59 bekannt. Die wirksame Substanz des "Neguvon" ist ein O,O-Dimethyl-2,2,2-trichlor-oxyäthylphosphonsäureester mit folgender Strukturformel :



Es ist ein weißes, schwach riechendes, kristallines Pulver, das leicht in Wasser und organischen Lösungsmitteln löslich ist, allerdings sind wässrige Lösungen nur beschränkt haltbar.

Soviel uns bekannt geworden ist, handelte es sich bei S 1752 um eine 2 %ige Lösung der wirksamen Substanz in einem organischen Lösungsmittel. Das Präparat lag als klare, leicht visköse Flüssigkeit vor. In Wasser war es unlöslich, mit Alkohol bildete es eine Emulsion, in Äther ließ es sich gut lösen. In allen Versuchen verwendeten wir S 1752 (Bayer) so, wie es uns geliefert wurde, ohne Zusatz irgendeines Lösungsmittels.

2. Verträglichkeits-Versuche

Da vom Hersteller für eine Dosierung keinerlei Hinweise gegeben waren, wurde in Vorversuchen zunächst die Verträglichkeit von S 1752 (Bayer) ermittelt.

Vorversuch a)

Aufgeteilt in drei Gruppen wurden 12 Mäusen steigende Mengen von S 1752 injiziert. Als Anfangsdosis wurden 0,4 ml gegeben, das entspricht 8 mg der wirksamen Substanz. Je vier Mäusen wurde das Präparat peroral (Gruppe 1), abdominal (Gruppe 2) und subcutan appliziert (Gruppe 3). Die Versuchstiere im Alter von 6-7 Wochen waren 25-29 g schwer. Die intraabdominale Injektion erfolgte mit einer verkürzten Injektionsnadel seitlich der Mittellinie, etwas caudal vom Nabel. Oral erhielten die Versuchstiere S 1752 mittels einer gebogenen Schlundsonde. Die Tiere schienen zunächst erschöpft, wurden jedoch kurze Zeit später von motorischer Unruhe getrieben und durchwühlten den Torf in ihren Behältern. Alle drei Gruppen zeigten die gleiche Reaktion nach Injektion von 8 mg des Wirkstoffes, wie Appetitverlust, Muskelzittern, gesträubtes Haarkleid, Sekretion der Tränen und Speicheldrüsen. Die Vergiftungserscheinungen bei den drei Versuchsgruppen traten jedoch unterschiedlich rasch auf. Bei der "oralen" Gruppe war eine Intoxikation schon nach 10 Minuten festzustellen, während bei der zweiten Gruppe die Erscheinungen wie Unruhe, Muskelzittern etc., 30 Minuten nach der Injektion auftraten. Bei der Gruppe 3 zeigten sich diese Reaktionen erst 2 1/2 Stunden nach Applikation des Wirkstoffes. Nach 24 Stunden hatten sich alle Mäuse gut erholt, bewegten sich normal und nahmen Nahrung auf. S 1752 wird also bei subcutaner

Applikation sehr viel langsamer von den Körpersäften aufgenommen, als bei oraler und intraabdominaler Applikation. Wahrscheinlich wurde das Präparat bei der 3. Gruppe ebenfalls vollständig resorbiert, denn die Intoxikationserscheinungen waren einige Stunden nach der Injektion des Wirkstoffs gleichstark.

Vorversuch b)

Am folgenden Tag wurde die Injektionsdosis von S 1752 (Bayer) um 2 mg der wirksamen Substanz erhöht und den gleichen Tieren der Versuchsgruppe 1, oral der Versuchsgruppe 2, intraabdominal, und der Versuchsgruppe 3, subkutan, verabreicht. Bei den Mäusen der 1. Gruppe kam es sofort nach der Injektion, bei der 2. Gruppe nach 15 Minuten zu der oben beschriebenen parasymphischen Erregung: Ataxie, fibrilläre Muskelzuckungen, Tränen und Speichelfluß. Die Tiere setzten öfter Kot ab, hatten unter Atemnot zu leiden. Die 3. Gruppe zeigte wiederum erst zwei Stunden nach der Injektion Intoxikationserscheinungen, unterschied sich jedoch nach 3 Stunden nicht in ihrem Verhalten von Gruppe 1 und 2. Die Vergiftungserscheinungen nahmen mit der Steigerung der Dosierung zu. Bei der 1. Versuchsgruppe starben 2 Tiere nach 24 Stunden, ein weiteres Tier starb nach 48 Stunden. Von den fünf Mäusen der 2. Gruppe überlebten nur zwei Tiere, und bei der 3. Gruppe war die Dosis von 10 mg des Präparates für 3 Mäuse letal nach 48 Stunden.

Vorversuch c)

Auf Grund der Verträglichkeitsversuche bei den vorhergehenden Untersuchungen wurde für die durchschnittlich 20 g schweren Tiere in der Hauptversuchsreihe eine Dosis von 4 mg der wirksamen Substanz in 0,2 ml festgesetzt.

Diese Dosis sollte am 1. und 3. Tag bzw. am 3. und 5. Tag p.i., bei den einzelnen Gruppen fortlaufend bis zum 31. p.i., injiziert werden. Die Behandlung mußte jedoch abgebrochen werden, weil es bei der 1. Hauptversuchsgruppe nach der zweiten Injektion am 3. Tag zu sehr heftigen Vergiftungserscheinungen gekommen war; fünf Tiere starben, so daß die Gruppe wiederholt werden mußte. In einem weiteren Versuch war demnach zu klären, zu welchem Zeitpunkt eine Zweitapplikation des Präparates möglich sei.

3 Gruppen von je vier Mäusen wurden 4 mg des Präparates injiziert. Je zwei Tiere erhielten S 1752 oral und intraabdominal. Die Zweitinjektion wurde bei Gruppe I am 3. Tag, bei Gruppe II am 4. Tag und bei Gruppe III am 5. Tag nach der Erstinjektion vorgenommen.

Die Tiere der ersten Versuchsgruppe waren noch zwei Tage nach der Zweitapplikation kurzatmig, benommen und verweigerten die Nahrung. Schon nach wenigen Stunden hatte sich ein Exophthalmus ausgebildet. Es kam zu keinem Todesfall, obwohl die Intoxikation bei den Mäusen der ersten Gruppe heftiger war als bei den beiden übrigen Versuchsgruppen. Bei der zweiten Gruppe traten die Zeichen einer parasymphathischen Erregung deutlicher auf als nach der ersten Applikation. Bei der Gruppe 3 ließ sich nach der Verabreichung von 4 mg des Präparates kein verändertes Verhalten feststellen. 8 Stunden nach der Zweitinjektion starb ein Tier der 3. Gruppe. Diese Maus machte jedoch schon vor Behandlungsbeginn einen kränklichen Eindruck, so daß die Todesursache nicht unmittelbar als Folge einer Intoxikation anzusehen ist.

E r g e b n i s s :

S 1752 wird bei der Erstinjektion in einer Dosis von 0,2 ml, entsprechend 0,4 mg der wirksamen Substanz,

sowohl intraabdominal als auch per os vertragen. Die Zweitapplikation kann frühestens am 5. Tag erfolgen, weil es andernfalls bei früherer Verabreichung zu meist tödlichen Vergiftungen kommt. Die Ursache dieser Beobachtung wurde nicht näher geprüft. Möglicherweise ist die Verweildauer bei dieser Form des Präparates im Körper länger als bei einer wässrigen Lösung der wirksamen Substanz. Auch andere Gründe sind denkbar.

3. Hauptversuche

Versuch a) Behandlungsbeginn vom 1. - 9. Tag p.i.

Es wurden 60 Mäuse mit je 100 Trichinen infiziert und in 5 Gruppen aufgeteilt. Für diese erste Hauptversuchsreihe war eine Behandlung vom 1. - 9. Tag vorgesehen; dieser Behandlungsversuch richtete sich also hauptsächlich gegen das Darmstadium der Trichinen. 10 der infizierten Tiere dienten als Kontrollmäuse und blieben unbehandelt. Für die durchschnittlich 20 g schweren Versuchstiere wurde in den Hauptversuchen eine Dosis von 0,2 ml, enthaltend 4 mg der wirksamen Substanz, festgesetzt, die im Laufe der Behandlung insgesamt zweimal appliziert werden sollte. Auf Grund der Ergebnisse bei den Verträglichkeitsversuchen wurde die Zweitapplikation erst am 5. Tag vorgenommen. 5 Tiere der Gruppe I a erhielten das Präparat am 1. und 5. Tag p.i. intraabdominal, 5 Mäusen der Gruppe I o wurde "S 1752" oral zugeführt. Gruppe IIa/ II o wurde am 3. und 8. Tag behandelt, Gruppe IIIa/ o am 5. und 10. Tag p.i. usw. bis zum 9. Tag p.i.

Die Verträglichkeit der gewählten Dosis war nicht sehr gut, denn die Tiere litten unter der Behandlung. Dies zeigte sich durch Appetitverlust, Mangel an Bewegungsfreudigkeit, gesträubtem Haarkleid und Muskelzittern.

Die Kontrolltiere der Versuchsgruppen I - III wurden am 40. Tag, die der IV. und V. Gruppe am 42. Tag p.i. getötet, die encystierten Trichinellen ausgezählt und pro Gramm Muskulatur berechnet. Die Kontrollen der I. Gruppe waren mit 1778 Trichinen pro Gramm Muskulatur besiedelt, die der übrigen Gruppen dieser Versuchsreihe im Durchschnitt mit 1310 Tr./g Muskulatur. Gruppe I

war als Gr. VI bei der zweiten Versuchsreihe wiederholt worden. Das Ergebnis der Behandlung wurde prozentual errechnet aus dem Verhältnis der abgestorbenen Trichinellen zu den Kontrollen. Bei Behandlungsbeginn vom 1. bis zum 5. Tag p.i. betrug der Therapieerfolg 100 %. Alle Tiere dieser Gruppe waren vollkommen trichinenfrei.

Tabelle I

Hauptversuch a) mit Behandlungsbeginn (vom 1.- 9.) Tag p.i.

Versuchsgruppe	Anzahl der mit je 100 Trich. behand. Mäuse	Tage der Behandlung n. d. Infektion	Applikationsart	Infektionsdosis/Tag	Tötung d. Mäuse am ... Tage n. d. Infektion	Durchschnitt d. gef. Tr. pro g. Musk.	%Satz der vernicht. Trich. gegenüber d. Kontr.	Trichinenfreie Tiere	Vorzeitige Todesfälle
I (VI) A	5	1. Tg. 5. Tg.	abdominal	4 mg	40	-	100 %	5	-
I (VI) O	5	1. 5.	peroral	4 mg	40	-	100 %	5	-
II A	5	3. 8.	a	4 mg	40	-	100 %	5	-
II O	5	3. 8.	p o	4 mg	40	-	100 %	5	-
III A	5	5. 10.	a	4 mg	40	-	100 %	5	-
III O	5	5. 10.	p o	4 mg	40	-	100 %	5	-
IV A	5	7. 12.	a	4 mg	42	43	96,8%	-	-
IV O	5	7. 12.	p o	4 mg	42	22	98,3%	-	-
V A	5	9. 14.	a	4 mg	42	106	91,9%	-	-
V O	5	9. 14.	p o	4 mg	42	46	96,5%	-	-
10 Kontrollen					40	1310			

b) Behandlungsbeginn vom 11. - 19. Tag p.i.

Aufbauend auf der vorhergehenden Versuchsreihe wurden wiederum 60 Mäuse mit je 100 Trichinen infiziert. Die Behandlung, die sich am 1. Hauptversuch hauptsächlich gegen das Darmstadium der Trichinellen richtete, reichte mit 5 Versuchsgruppen bis zum 9. Tag nach der Infektion. Die zweite Versuchsreihe nahm die Behandlung mit dem 11. Tag auf und führte sie bis zum 19. Tag p.i. durch. Applikationsart und -dauer wurden analog dem 1. Hauptversuch unverändert beibehalten. Jedem Tier wurden insgesamt 8 mg = 0,4 ml des Präparates auf zwei Injektionen verteilt, in einem Zeitraum von 5 Tagen injiziert. Gruppe 7 wurde am 11. und 16. Tag behandelt, bei Gruppen 8, 9, 10 und 11 setzte die Behandlung am 13., 15., 17. und 19. Tage ein. Alle Tiere waren bei Versuchsbeginn etwa gleichschwer (18-22 g). Es starben zwei Tiere. (Eine Aspirationspneumonie unmittelbar nach der Einführung der Schlundsonde, der zweite Todesfall konnte nicht geklärt werden.) Nach der Tötung der Kontrollen am 40. Tag p.i. wurden die Trichinen in der beschriebenen Weise ausgezählt. Die durchschnittliche Besiedlung ergab hier 1778 Trich./ g Muskulatur. "S 1752" erwies sich auch in dieser Versuchsreihe als gut wirksam bei der Abtötung der Wandertrichinen. Am ungünstigsten lagen die Behandlungserfolge zur Zeit der Blutpassage zwischen dem 11. und 13. Tag p.i. Hier überlebten 14 % der Trichinellen. Im Durchschnitt konnten in dieser Versuchsreihe nur 6,7% der Trichinen medikamentös nicht erfaßt werden. Siehe Tabelle II.

Vergleicht man die Therapieerfolge bei der peroralen und intraabdominalen Applikationsweise miteinander, so liegen die Ergebnisse bei den oralen Gruppen etwas günstiger (mit Ausnahmen bis zu 5 %).

Tabelle II

Hauptversuch b) mit Behandlungsbeginn (vom 11.- 19.) p.i.

Versuchs- gruppe	Anzahl der mit je 100 Trich.beh. Mäuse	Tage der Behandlg. nach der Infektion	Applika- tionsart	Infektions- dosis/Tag	Tötung der Mäu- se am... Tag.n.d. Infektion	Durchschn. d.gef.Trich. pro g.Mus- kulatur	%Satz d. Trich.vern. Trich. gegenüb. denKontl.	Trichi- nenfrei Tiere	Todesfälle
VII A	5	11	a	4 mg	40	312	82,6 %	-	-
VII O	5	11	p o	4 mg	40	188	89,5 %	-	-
VIII A	5	13	a	4 mg	40	218	87,9 %	-	-
VIII O	5	13	p o	4 mg	40	97	94,6 %	-	-
IX A	5	15	a	4 mg	42	145	89,6 %	-	-
IX O	5	15	p o	4 mg	42	187	91,9 %	-	-
X A	5	17	a	4 mg	42	266	85,0 %	-	-
X O	5	17	p o	4 mg	42	125	93,0 %	-	-
XI A	5	19	a	4 mg	42	134	94,6 %	-	-
XI O	5	19	p o	4 mg	42	63	96,5 %	-	-
10 Kontrollen	-	-	-	-	40	1778	-	-	-

Versuch c) mit Behandlungsbeginn vom 21.-31. Tag p.i.

Die Behandlung in dieser letzten Versuchsreihe richtete sich gegen frisch abgekapselte Trichinellen.

60 Mäuse wurden wiederum mit je 100 Trichinen infiziert und an die letzte Gruppe der vorhergehenden Versuchsreihe anschließend, vom 21. - 31. Tag p.i. behandelt. 10 der infizierten Mäuse wurden wiederum von der Behandlung ausgeschlossen und dienten als Kontrollen.

In dieser 3. Versuchsreihe traten 6 Todesfälle auf. Ein Tier ging nach der Injektion an einem intraabdominellen Hämatom zu Grunde, drei weitere Tiere waren schon vor Behandlungsbeginn dystroph. Bei der Sektion konnten Oxyguren im Darm nachgewiesen werden. Bei zwei Mäusen war die Todesursache nicht zu klären.

Die Kontrolltiere sowie Gruppe 13 wurden am 39. Tag, die Gruppen 14 und 15 am 41. Tag und die Gruppe 16 und 17 am 42. Tag nach der Infektion getötet. Die Kontrollen waren durchschnittlich mit 1276 Trichinen pro Gramm Muskulatur besiedelt.

In allen Fällen war eine sehr gute Wirkung von "S 1752" (Bayer) auf frischencystierte Trichinellen zu beobachten. Der Behandlungserfolg lag um 90 %. Vollkommen trichinenfreie Tiere wurden nicht gefunden. Bei den behandelten Versuchstieren waren einige Trichinen deutlich geschädigt, die bei der Auszählung mitberücksichtigt wurden. Weiterer Untersuchungen bedarf es, inwieweit diese Parasiten noch regenerationsfähig sind, oder der Vernichtung durch den Wirtskörper anheimfallen.

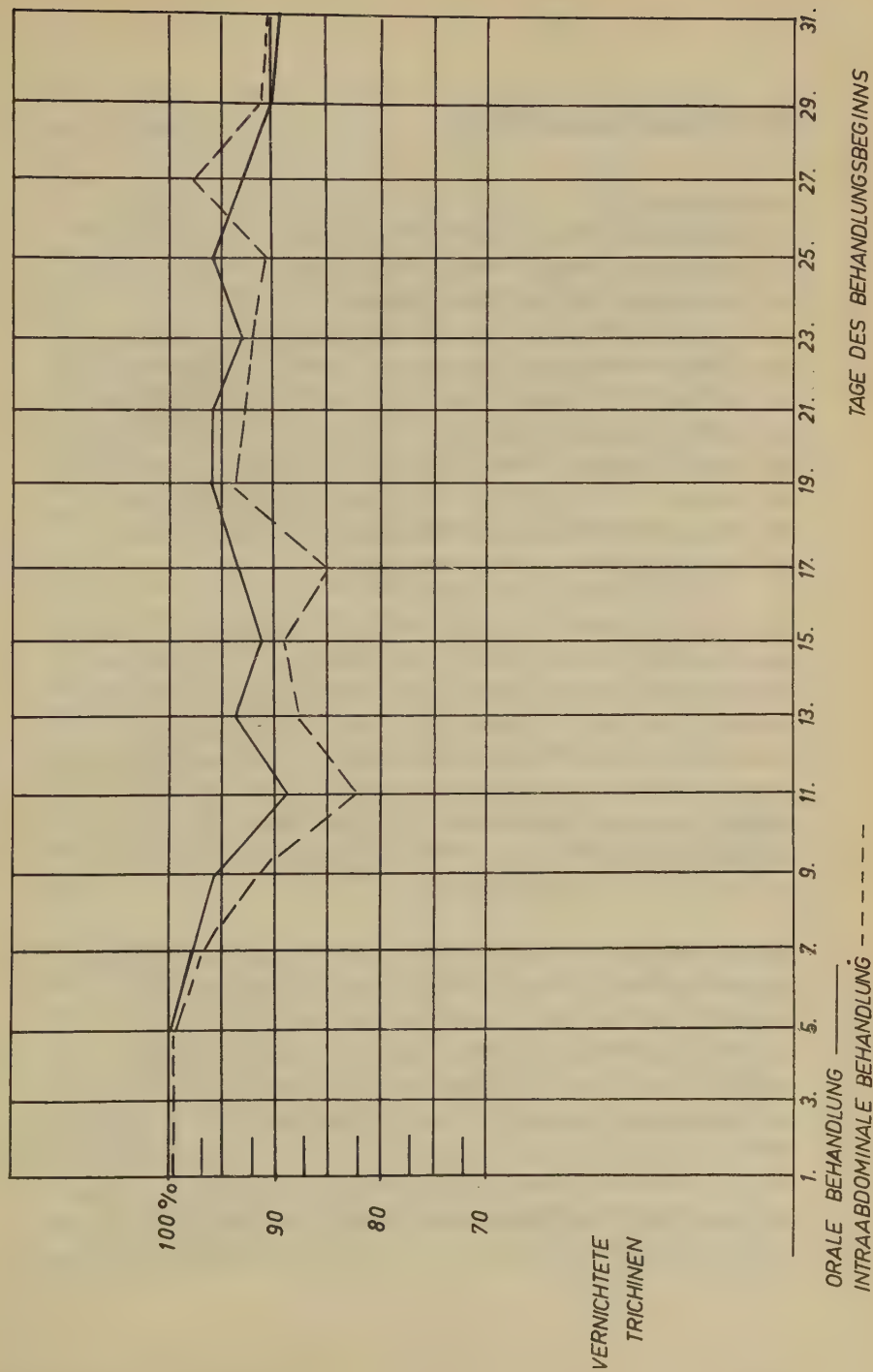
Wägt man in dieser Versuchsreihe die Wirkung des Präparates bei oraler und intraabdominaler Applikation gegeneinander ab, so lag bei oralen Gaben von "S 1752" bis

Hauptversuch c) mit Behandlungsbeginn (vom 21.- 31.) Tag p.i.

Versuchs- gruppe	Anzahl d. mit je 100 Trich. n.d. In- beh. Mäuse	Tage der Behandl. n.d. In- fekt.	Applika- tionsart	Infekti- onsdosis	Tötung d. Mäuse am ... Tage n.d. Inf.	Durch- schnittl. d. gef. Trich. pro g. Muskul.	%Satz d. vern. Trich. gegenüb. d. Kontr.	Trichinen- freie Tiere	Todes- fälle
XII A	5	21 26	abdominal	4 mg	39	79	93,9 %	-	
XII O	5	21 26	peroral	4 mg	39	58	95,6 %	-	1
XIII A	5	23 28	a	4 mg	39	97	92,5 %	-	
XIII O	5	23 28	p o	4 mg	39	79	93,9 %	-	
XIV A	5	25 30	a	4 mg	41	118	91,0 %	-	2
XIV O	5	25 30	p o	4 mg	41	61	95,3 %	-	
XV A	5	27 32	a	4 mg	41	26	98,0 %	-	
XV O	5	27 32	p o	4 mg	41	83	93,6 %	-	
XVI A	5	29 34	a	4 mg	42	109	91,6 %	-	
XVI O	5	29 34	p o	4 mg	42	123	90,5 %	-	
XVII A	5	31 36	a	4 mg	42	126	90,3 %	-	3
XVII O	5	31 36	p o	4 mg	42	145	88,8 %	-	
10 Kontrollen					39	1276			

zum 25. Behandlungstag p.i. der Prozentsatz der abgetöteten Trichinen etwas höher, vom 27. Behandlungstag ab p.i. jedoch waren die Ergebnisse bei intraabdominaler Applikation günstiger.

ERGEBNIS DER HAUPTVERSUCHE



Besprechung der Ergebnisse

Nachdem von S C H O O P und L A M I N A in den Phosphonsäureestern eine wirksame Substanz gegen die Trichinellen gefunden worden war, kam es darauf an, die geeignete Form für das Präparat und für die Verabreichung zu finden. Die Untersuchungen im Institut für Zoonosenforschung haben sich bisher im wesentlichen mit der wäßrigen Lösung des O,O-Dimethyl-2,2,2-trichloroxyäthylphosphonsäureester ("Neguvon") befaßt. In den Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Applikationsart für die Wirkung von relativ untergeordneter Bedeutung ist. In der Mehrzahl der Fälle erfolgte die Applikation intraabdominal.

Den vorliegenden Versuchen liegt die Aufgabe zu Grunde, eine weitere, bisher nicht geprüfte Form eines Phosphonsäureester-Präparates auf seine Brauchbarkeit zu prüfen. Die darin enthaltene wirksame Substanz ist wiederum die gleiche (O,O-Dimethyl-2,2,2-trichloroxyäthylphosphonsäureester). Es handelt sich dabei um eine Lösung in einem organischen Lösungsmittel. Die Menge des Wirkstoffes beträgt 2 %. Das Präparat trägt die Bezeichnung "S 1752" (BAYER).

Um die Prüfung durchführen zu können, war es zunächst notwendig, die Verträglichkeit des Präparates festzustellen. Da über die Dosierung von "S 1752" (Bayer) keinerlei Hinweise gegeben waren, wurde in Vorversuchen zunächst die Verträglichkeit des Präparates bei weißen Mäusen ermittelt. Die Anfangsdosis von 8 mg wirksamer Substanz in 0,4 ml war eindeutig zu hoch gewählt, denn die Versuchstiere zeigten nach der Injektion sehr heftige Intoxikationserscheinungen. Die Maximaldosis von 10 mg wirksamer Substanz in 0,5 ml überschritt die Grenze

der Verträglichkeit. Bei den 12 Versuchstieren gab es 9 Todesfälle.

Als verträgliche Dosis ergab sich eine Menge von 0,2 ml mit einem Gehalt von 4 mg an Wirkstoff. Die Applikation konnte sowohl per os als auch intraabdominal erfolgen. Diese Dosis konnte ein zweites Mal erst am 5. Tage nach der ersten Applikation verabreicht werden, andernfalls war mit einer größeren Zahl von Todesfällen, mindestens aber mit dem Auftreten schwerer Vergiftungserscheinungen zu rechnen. Die Frage, warum eine zweite Gabe, sei es per os oder sei es intraabdominell, in kürzerem Abstände zur Erstapplikation nicht vertragen wurde, ist nicht geprüft worden. Zunächst genügte die Feststellung der Tatsache.

Es muß noch erwähnt werden, daß die Verträglichkeit der Dosis insofern nicht besonders gut war, als die Tiere offensichtlich unter der Behandlung litten, wie es sich durch Appetitverlust, Mangel an Bewegungsfreudigkeit, gesträubtes Haarkleid u.a. dokumentierte. Wenn dennoch diese Dosis in den Hauptversuchen später zur Anwendung kam, so lag der Grund vor allem darin, daß SCHOOP und LAMINA und Mitarbeiter bei einer geringeren Dosis der wirksamen Substanz in wäßriger Lösung eine nicht voll befriedigende Wirkung sahen.

Die Hauptversuche wurden in 3 große Gruppen unterteilt. Das Kriterium der Einteilung war der Versuchsbeginn, gemessen in Tagen nach der Infektion der Tiere. Der Abstand der beiden Gruppen voneinander betrug 2 Tage; es lag immer 1 Tag dazwischen, an dem keine neue Gruppe in Behandlung genommen wurde. Es ergibt sich also folgendes Bild :

- I. Gruppe Behandlungsbeginn am 1. Tage nach der Infektion.

II. Gruppe Behandlungsbeginn am 3. Tage nach der Infektion usw.

Jede behandelte Gruppe von Mäusen bestand aus 10 Tieren, von denen jeweils 5 intraabdominal und 5 per os behandelt wurden. Das Präparat wurde jedem Tier zweimal gegeben, und zwar im Abstand von 5 Tagen. Eine Ausnahme davon machte nur die Gruppe I, bei der nur zwei Tage Abstand gewählt wurde und bei der es infolgedessen sofort zu hohen Ausfällen kam, so daß dieser Versuch mit der Gruppe VI wiederholt werden mußte.

Insgesamt wurden in die Hauptversuche 200 Mäuse einbezogen, von denen eine Gruppe von jeweils 10 Tieren als Kontrolle für die zusammengefaßte Gruppe ihres Hauptversuches fungierte. Das Ergebnis der Behandlung wurde im Prozentsatz an abgestorbenen Trichinellen, bezogen auf die dazugehörige Kontrollgruppe, ausgedrückt. Um klare Ergebnisse zu erzielen, wurden bei Kontrollen und behandelten Mäusen sämtliche Trichinen gezählt. Bei den behandelten Tieren war ein gewisser Prozentsatz deutlich geschädigt. Wenn diese Parasiten, um nicht subjektiven Mißdeutungen zu unterliegen, mitgezählt worden sind, so sind damit wahrscheinlich einige Schmarotzer erfaßt worden, die bereits abgestorben waren. Die errechneten Ergebnisse sind also keinesfalls zu günstig dargestellt.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß ein früher Behandlungsbeginn für den Erfolg günstig ist. In allen Fällen, in denen am 5. Tag p.i. oder früher die erste Applikation des Präparates erfolgte, wurde Parasitenfreiheit des behandelten Tieres erzielt. Bei späterem Behandlungsbeginn gelang das in keinem Falle. Die Applikationsart hatte auf dieses Ergebnis keinen Einfluß.

Setzte die Behandlung am 7. Tage oder später ein, so lag der Erfolg um eine Vernichtungsquote von 90 %. Interessanterweise verläuft die Erfolgskurve, die man erhält, wenn man auf der Abszisse den Behandlungsbeginn, auf der Ordinate die prozentuale Vernichtungsquote der Parasiten einträgt, bei oraler Behandlung etwas günstiger, als bei der intraabdominalen. Diese Erscheinung wäre leicht zu erklären, falls es sich da - bei nur um die Abtötung der Trichinellen handelte, die sich noch im Darm aufhielten. Das aber kann nicht der Fall sein, weil bei späterem Behandlungsbeginn, zu einer Zeit, zu der keine Nachkommenschaft mehr produziert wird, die Kurve ebenfalls höher liegt. Erst bei einem Behandlungsbeginn 4 Wochen nach der Infektion tritt eine Umkehrung ein. Diese Beobachtungen bedürfen der Nachprüfung. Die Interpretation ist schwierig. Vielleicht ist die Resorption der wirksamen Substanz nach oraler Verabfolgung etwas besser; darauf scheinen auch die Beobachtungen in den Versuchen hinzudeuten, denn hier treten nämlich die Intoxikationserscheinungen nach peroraler Applikation schneller auf, als nach abdominaler Injektion.

Ein zwar nicht sehr deutlich ausgeprägter, immerhin aber sichtbarer Tiefpunkt bei den Abtötungsergebnissen liegt bei dem 11. Behandlungstag p.i. Das ist eine Erscheinung, die auch bei anderen Applikationsarten von den genannten Autoren immer wieder gesehen worden ist.

Die Untersuchungsergebnisse in ihrer Gesamtheit dürften beweisen, daß das Präparat in der vorliegenden Form imstande ist, die Parasiten im Körper weitgehend zu vernichten. Von dem ersten Tage nach der Infektion, während welcher ein 100 %iger Erfolg erzielt wird, abgesehen, liegt die Erfolgsquote der Trichinellenvernichtung um 90 %, das gilt für Wandertrichinen wie für eingekap-

selte Muskeltrichinellen. Bemerkenswerterweise wird dieses Ergebnis mit nur zwei Applikationen erreicht. Daher ist die Menge der insgesamt verabreichten wirksamen Substanz relativ gering. Mit Feststellung dieser Tatsachen dürfte die weitere Beschäftigung mit diesem Präparat angezeigt sein.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Es wurde das Versuchspräparat " S 1752 " (Bayer) 2 % auf seine Wirksamkeit gegenüber der experimentellen Trichineninfektion der Maus geprüft.
2. Das Präparat ließ sich oral und abdominal in einer Dosis von 0,2 ml, enthaltend 4 mg der wirksamen Substanz, anwenden. Die Zweitapplikation durfte nicht vor dem 5. Tage nach der Erstapplikation vorgenommen werden, andernfalls traten Intoxikationen der Versuchstiere ein.
3. Bei frühem Versuchsbeginn bis zum 5. Tage p.i. wurden die Parasiten bei beiden Applikationsarten restlos vernichtet.
4. Bei späterem Behandlungsbeginn konnten bei oraler Applikation um 90 %, bei intraabdominaler zwischen 80 % und 90 % der Trichinellen vernichtet werden.
5. Mit einer relativ kleinen Dosis wirksamer Substanz läßt sich der weitaus größte Prozentsatz der Trichinen im Körper vernichten. Bei frühzeitiger Applikation gelingt sogar die 100 %ige Abtötung der Trichinellen.

Herrn Prof. Dr. G. S C H O O P danke ich
für die freundliche Überlassung des Themas
sowie für Anregungen und Hinweise.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. L A M I N A
für die Hilfe bei der Ausführung der vorlie-
genden Versuche.

L i t e r a t u r - V e r z e i c h n i s

1. ALICATA, J.E. Effects of roentgen radiation
J. Parasitol. 37, 491 (1951) ref. in
The Vet. Bull. 3109 (1953)
2. BERGMANN, R. Über die parasitizide Wirkung des
Phosphorsäureester "Asuntol" (Bayer)
auf *Trichinella spiralis* bei experi-
mentell infizierten Mäusen.
Inaug.Diss. Gießen (1961).
3. BOLLE, W.R. "Neguvon", ein äußerlich und inner -
lich anwendbares Insektizid, Larvi -
zid und Ascarizid. Vet.med. Nachr..
3, 155, (1956)
4. BOLLE, W.R. Neue Wege zur Bekämpfung der Derma -
tobia hominis mit "NEGUVON" und
"ASUNTOL".
Vet.med.Nachr. 4, 193 (1958)
5. CHAN, K.F. und
BROWN, H.W. Treatment of experimental trichinosis
in mice with piperazine hydrochloride.
Amer.J.trop.Med.Hyg. 3, 745 (1954)
6. DICKEL, G. Die Wirkung des Phosphorsäureester-
präparates "Neguvon" (Bayer) unter
Prämedikation der Antidote "PAM"
(Bayer) und Atropin auf experimen -
telle Trichinose bei Mäusen.
Inaug. Diss. Vet. med. Gießen (1961)
7. ERDMANN, W. D. und
LENDLE, L. Vergiftung mit esteraseblockierenden
Insektiziden aus der Gruppe der or-
gan.Phosphorsäureester.
Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkunde 10,
104 (1958)
8. ERNST, M. Immunität gegen Trichinen.
Inaug. Diss. Frankfurt/Main (1957)

9. FLURY, F. Beiträge zur Chemie und Toxikologie der Trichinen.
Arch. f. experiment. Pathologie und Pharmakologie, 73, 164 (1913)
10. GAASE, A. Die Trichinoseforschung nach dem Schrifttum der letzten Jahre.
Dtsch. Mi. Arzt. 7, 442 (1942)
11. GAASE, A. Der immunbiolog. Nachweis der Trichinose bei Mensch und Tier.
Zeitschr. d. Hyg., 129, 439 (1949)
12. HARTMANN, P. Die Einwirkung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen auf die Entwicklung von *Trichinella spiralis*.
Inaug. Diss. Frankfurt/Main (1963)
13. HEATH, D.F. The Toxic action of some phosphorus anticholinesterases with cationic groups.
Biochem. Pharmacol. 6, 244 (1961)
14. HOFF, F. Behandlung innerer Krankheiten,
9. Aufl. 178 (1960)
Thieme-Verlag Stuttgart
15. SCHMIDT, P. und KISSLING, O. Über Trichinose: Ein kauistischer Beitrag zur Klinik und Therapie der Trichinose.
Med. Klinik, 37, 42 (1941)
16. KASECKER, H. Über die Geschichte und Bekämpfung der Trichinose.
Inaug. Diss. München (1951)
17. KATHE, J. und PETERS, F. Über die Trichinose und ihren Nachweis unter bes. Berücksichtigung der immunbiolog. Verfahren.
Zeitschr. f. Immun. Forschung, 103, 1 (1943)

18. KOCHLOWSKI, B. The biologie of trichinella in the
body of fresh water fish.
Med. Vet. 1, 228 (1945)
Ref. in The Vet. Bull. (1948)
19. KIKUTH, W. und
GRUMBACH, A. Die toxische Wirkung der Trichinose.
Infektionskrankheiten, 2, 1550 (1958)
Thieme-Verlag Stuttgart.
20. LAMINA, J. Die Verbreitung der Trichinella
spiralis bei Mensch und Tier.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 68, 268
(1961)
21. LENTZE, F.A. Entwicklung, Epidemiologie und Be -
kämpfung der in Deutschland vorkom -
menden menschlichen Helminthosen.
Zbl. Bakt.- Abt. 1.Org. 154: 75 (1949)
22. LEUTHARDT, F. Lehrbuch der physiol. Chemie.
14, 660 (1959) De Gruyter Berlin.
23. MINNIG, W. und
DING, P. Hetrazan-Wirkung bei Mäusetrichinose.
Zeitschr. f. Trop.Med. und Parasito -
logie. 3, 103 (1951/52)
24. PETRASCH, L. und
GAASE, A. Die Trichinoseepidemie in Meschede /
Westfalen im Herbst 1950.
Ärztl. Wschr. 7, 296 (1951)
25. PIEKARSKI, G. Lehrbuch der Parasitologie (1954),
Springer, Berlin
26. RASCHKE, R. Vergleich deutscher und amerikanischer
Maßnahmen zur Verhütung der mensch -
lichen Trichinose.
Tierärztl. Umschau, 10, 357 (1956)

27. REINHARD, E.G. Landmarks of Parasitology.
Exp. Parasit. 7, 108 (1958).
Ref. in The Vet. Bull. 3628 (1958)
28. RIEDEL, B. SULFONAMIDE therapy of trichinized
white mice.
J. Parasit. 36, 582 (1950)
29. RUCKEBUSCH, J. On the acetylcholinesterase system
and the pharmac. of organ. phos -
phoric insecticides.
Cah. Med. Vet. 34, 126 (1961)
30. SCHAUMANN, W. Bestimmung der Cholinesterase -
Aktivität in vitro und Besprechung
der Aktivität in vivo nach Ver-
giftung mit Alkyl-Phosphaten.
31. SCHAUMANN, W. Beziehungen zwischen den peripheren
und zentralen Wirkungen von Cholin-
esterasehemmern und der Inaktivie -
rung der Cholinesterase.
Nauyn-Schmiedeberg, Arch. exp.Path.
und Pharmak. 239, 81 (1960)
32. SCHMIDT, H. W. Die Abriegelung der Trichinose -
infektion nach neuen Gesichtspunk-
ten.
Med. Klinik. 37, 1180 (1941).
33. SCHOOP, G. Gibt es einen latenten Trichinen-
befall unter der deutschen Bevöl-
kerung ?
Monatshefte f. Tierhkl. 7, 269
(1955)
34. SCHOOP, G. und
LAMINA, J. Über die vermizide Wirkung von
"Neguvon" auf Trichinella spiralis
in experimentell infizierten Mäusen.
Monatsh. f. Tierhkl. 11, 167
(1959)

35. SCHOOP, G. und
SCHADE, M. Der Fuchs als Verbreiter der Trichinose.
Dtsch. Tierärztl. Wochr. 47, 553
(1939)
36. SCHOOP, G. und
LAMINA, J. Über die Wirkung eines wasserlöslichen Phosphonsäureesters auf Trichinellen.
Zbl. f. Bakteriologie. 186, 562 (1962)
37. SCHOOP, G. und
LAMINA, J. Über die Wirkung eines wasserlöslichen Phosphonsäureesters auf Trichinellen.
Zbl. f. Bakteriologie. 187, 391 (1962)
38. WAGNER, O. Fortschritte der Trichinenforschung in epidemiolog. und diagnost. Hinsicht.
Ztschr. f. phys. Chemie, 274, 116
(1942)
39. WAGNER, O. Trichinose bei Tier und Mensch.
Zbl. f. Bakteriologie. 154/55, 160
(1949)
-

B I L D U N G S G A N G

Geboren	am 12. August 1937 in Fulda
Schulbesuch	von Herbst 1943 bis Ostern 1949 die Volksschule in Fulda, anschließend das Realgymnasium in Fulda bis zur
Reifeprüfung	im Frühjahr 1958.
Immatrikulation	zum SS 1958 an der Medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe - Univer - sität in Frankfurt am Main. Vom SS 1958 an besuchte ich 6 Semester die Universität in Frankfurt/Main bis zur
Ärztlichen Vorpr.	im WS 1960/61. Danach studierte ich 2 Semester an der Ludwig Maximilian-Universität in München, 3 Semester die Universität in Frankfurt am Main.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer:

Prof.Dr.	R. Thiel	Augenheilkunde
Prof.Dr.	W. Lieb	"
Priv.Doiz.Dr	J.Otto	"
Prof.Dr.	D.Starck	Top. Anatomie
Prof.Dr.	H.Frick	"
Prof.Dr.	R.Geisendörfer	Chirurgie
Prof.Dr.	E.Ungeheuer	"
Priv.Doiz.Dr.	H.Weber	"
Prof.Dr.	O.Käser	Frauenheilkunde
Prof.Dr.	A.Schwenzer	"
Priv.Doiz.Dr.	H.Brehm	"
Prof.Dr.	J.Gerchow	Gerichtsmedizin
Prof.Dr.	G.Grüner	"
Prof.Dr.	K.Luff	"
Prof.Dr.Dr.	W.Artelt	Geschichte der Medizin
Prof.Dr.	R.Mittermaier	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Prof.Dr.	H.Boenninghaus	"
Prof.Dr.	F.Herrmann	Haut und Geschlechtskrankheiten
Prof.Dr.	G.Leonhardi	"
Prof.Dr.	G.Steigleder	"
Prof.Dr.	K.Herzberg	Hygiene
Prof.Dr.	F.Moff	Innere Medizin
Prof.Dr.	J.Grey	"
Prof.Dr.	A.Gebauer	"
Prof.Dr.	K.Radenbach	"
Prof.Dr.	H.Martin	"

Prof. Dr.	K.Weise	Kinderheilkunde
Prof. Dr.	W.Amelung	Naturheilkunde
Prof. Dr.	J.Zutt	Neurologie und Psychiatrie
Prof. Dr.	R.Frowein	"
Priv.Doiz.Dr.	R.Degkwitz	"
Prof. Dr.	E.Güntz	Orthopädie
Priv.Doiz.Dr.	H.Schoberth	"
Prof. Dr.	W.Rotter	Pathologie
Prof. Dr.	G.Kahlau	"
Prof. Dr.	P.Holtz	Pharmakologie
Prof. Dr.	E.Westermann	"
Prof. Dr.	G.Schoop	Zoonosen

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

" Prüfung eines Phosphonsäureesterpräparates auf seine Wirksamkeit gegenüber Trichinellen bei der experimentell infizierten Maus."

im Zoonoseninstitut Frankfurt/Main unter Leitung von Prof.

Dr. G. SCHOOP mit Unterstützung durch Dr. J. LAMINA ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher bei keiner in - und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Neu Isenburg, den 16.8.1964

Wolfgang Herlinger

